

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 214–216

KURZMITTEILUNG

Isoenzyme der α -Amylase im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose

Von N. van Husen, H.-Chr. Dominick, U. Gerlach und D. Kamanabroo

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. W. H. Hauss) und der Universitätskinderklinik (Direktor: Prof. Dr. K. D. Bachmann) Münster

(Eingegangen am 13. November 1973/28. Februar 1974)

Bei 34 Patienten mit Cystischer Fibrose wurden die Isoenzyme der α -Amylase (α -1,4-Glucan 4-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) im Serum mikroelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Isoamylasemuster von 14 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Folgende Befunde wurden erhoben:

1. Im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose konnte 13 mal nur Pankreasamylase, 17 mal nur Speichelamylase nachgewiesen werden. 4 mal fand sich sowohl Speichel- als auch Pankreasamylase im Serum.
2. Bei gesunden Kontrollpersonen wurde 12 mal Speichel- und Pankreasamylase im Serum gefunden, 2 mal nur Pankreaisoamylase.
3. Unter Berücksichtigung der Literatur wird das häufige Fehlen von Pankreasamylase im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose als Ausdruck einer verminderten Pankreasfunktion gedeutet.

Isoenzymes of α -amylase in the sera of patients with cystic fibrosis

The isoenzymes of α -amylase (α -1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) in the sera of 34 patients with cystic fibrosis were separated by microelectrophoresis and compared with the isoamylase pattern of 14 healthy control sera.

1. Of the sera from cystic fibrosis patients, 13 showed only pancreatic amylase, 17 only salivary amylase, while 4 sera contained both amylases.
2. Of the healthy control sera, 12 showed salivary and pancreatic amylase, and 2 showed only pancreatic isoamylase.
3. Taking into account the existing literature, we consider that the frequent absence of pancreatic amylase from the sera of patients with cystic fibrosis is due to a decreased pancreatic function.

Die Aktivitätsmessung organspezifischer Enzyme im Serum erlaubt häufig Rückschlüsse auf den Zustand des Herkunftsorgans. Aktivitäten von Enzymen im Serum, die verschiedenen Organen entstammen, können erst nach Auftrennung in Isoenzyme auf ein bestimmtes Organ bezogen werden. Die Aktivitätsmessungen von α -Amylase (α -1,4-Glucan 4-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) im Serum und Urin wurden von vielen Autoren in der Diagnostik von Pankreaserkrankungen benutzt (1–5). Eine Auftrennung der α -Amylase des Serums in Isoenzyme gestattet eine weitergehende Zuordnung der gemessenen Serumaktivitäten zu Herkunftorganen. Während im Speichel bis zu 8 Isoenzyme der α -Amylase beschrieben wurden, sind im menschlichen Serum 1–4 Isoenzyme nachweisbar (6, 7). In den weitaus meisten Fällen finden sich 2 Isoenzyme der α -Amylase, von denen das langsamere anodisch wandernde aus dem Pankreas und das schnellere anodisch wandernde aus der Speicheldrüse stammt (7–11). Seltener finden sich zwei dem Pankreas zuzuordnende Isoenzyme im Serum und gelegentlich auch 2 der Speicheldrüse zugehörige Isoamylasen sowie Kombinationen der beschriebenen Formen (7, 9). Folgt man der Nomenklatur von Hobbs (7), so bezeichnet man nach ihrer Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld – von Kathode zur Anode zählend – die dem Pankreas zugeordneten Isoenzyme im Serum mit P₁, P₂ sowie selten P₃ und die der Speicheldrüse zugehörenden Isoenzyme mit S₁ und S₂.

Die Cystische Fibrose – auch als Mukoviscidose bezeichnet – ist durch eine Sekreteindickung der betroffenen Organe gekennzeichnet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchung von Isoenzymen der α -Amylase im Serum die Beteiligung von Pankreas und Speicheldrüse am Krankheitsprozess zu beurteilen.

Patienten und Methoden

Die Untersuchung umfaßt 34 Patienten der Universitätskinderklinik und der Medizinischen Universitätsklinik Münster mit klinisch sowie durch Pilocarpin-Iontophorese gesicherter Cystischer Fibrose. Das Alter der Patienten reichte von 4–20 Jahren bei einem Altersmedian von 7,9 Jahren. Zum Vergleich wurden 14 gesunde Kinder ähnlicher Altersstufen untersucht, deren α -Amylaseaktivität im Normbereich lag. Serum wurde nach der Entnahme bei – 20° C bis zur weiteren Untersuchung eingefroren.

Die Gesamtaktivität der α -Amylase wurde nach Ceska et al (12) mit dem Phabedas-Amylasetest¹⁾ bestimmt. Die Auftrennung der α -Amylase in ihre Isoenzyme erfolgte elektrophoretisch in Modifikation eines von Boettcher et al (13) angegebenen Verfahrens in einer Boskamp-Elektrophoresekammer (Fa. Boskamp Geräte Bau, Hersel/Bonn).

Die Isoenzyme der α -Amylase wurden amyloklastisch im Trenngel nachgewiesen, wozu das gesamte Gel für 30 Minuten bei 37° C in 0,5% gekochter Stärke (Stärke löslich, p. A., Merck 1252) mit 40 mmol/l Natriumchloridzusatz inkubiert wurde. Die Farbentwicklung erfolgte durch Inkubation in Lugolscher Lösung (Merck, Nr. 9261) für etwa 3 Minuten. Für die einzelnen Isoenzymbanden wurden die Wanderungsquotienten ermittelt.

Die beobachteten Isoamylase-Aktivitätsbanden wurden auf Grund eines Vergleichsserums, das in jedem Versuchsansatz

¹⁾ Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

mitlief, den Isoamylasen P_1 , P_2 , S_1 und S_2 zugeordnet. Statistisch wurde die Reproduzierbarkeit von Iso- α -Amylase-auftritten sowohl innerhalb eines Versuchsansatzes als auch zwischen einzelnen Ansätzen durch Vergleich der Wanderungsquotienten untersucht. Schließlich wurde überprüft, ob die Wanderungsquotienten der Amylasebanden von Patientenserum in den 2 s-Bereich derjenigen der Reproduzierbarkeitskontrolle fielen.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit zwischen einzelnen Versuchsansätzen stand die Isoamylaseauftrennung im Serum eines Pankreatitispatienten mit den Isoamylasen P_1 , P_2 und S_1 in insgesamt 14 verschiedenen Untersuchungsansätzen zur Verfügung. Der aus den Wanderungsquotienten errechnete Variationskoeffizient betrug für die Isoamylasen P_2 9,1 und für S_1 8,2. Demgegenüber war die Streuung für die P_1 -Bande mit einem Variationskoeffizienten von 20,2 deutlich größer.

Die Prüfung der Streuung innerhalb eines Versuchsansatzes wurde an der am häufigsten vertretenen Bande S_1 in insgesamt 25 parallel untersuchten Seren geprüft. Die Differenz der einzelnen Wanderungsquotienten eines Parallelansatzes in Prozent des gemeinsamen Mittelwertes betrug im Durchschnitt 2,8% (Medianwert: 1,7%).

Im Serum von 34 Patienten mit Cystischer Fibrose wurde 27 mal nur eine Amylaseaktivitätsbande nachgewiesen, insgesamt 7 mal traten 2 Isoenzyme der Amylase auf. Betrachtet man die Isoamylasen nach ihrem Herkunftsorgan, so findet man bei 30 von 34 Patienten Isoamylasen nur eines Organs (vgl. Tab. 1). Nur im Serum von 4 Patienten wurde sowohl Pankreas- als auch Speichelamylase nachgewiesen. Unter den Patienten mit Isoamylasen nur eines Organs im Serum fand sich bei 17 bzw. 57% Speichelamylase und bei 13 bzw. 43% Pankreasamylase. Eine Abhängigkeit zwischen dem

Isoenzymmuster der α -Amylase im Serum und der Gesamtaktivität bestand im hier untersuchten Krankengut nicht.

Demgegenüber fand sich im Serum von 14 gesunden Kindern wie Tabelle 1 zeigt, 12 mal die Kombination der Isoamylasen P_2 und S_1 . Nur zweimal wurde ausschließlich die Pankreasisoamylase P_1 nachgewiesen. Der Unterschied im Isoamylasemuster zu Kindern mit Cystischer Fibrose ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$).

Während die Aktivitätsmessung organspezifischer Enzyme direkt Rückschlüsse auf das Herkunftsorgan erlaubt, müssen Enzyme, die in mehreren Organen vorkommen, erst in organspezifische Isoenzyme aufgetrennt werden, um ihre Bedeutung für die Diagnostik zu steigern. Dazu hat sich neben anderen Verfahren schon früher die Trennung in Polyacrylamidgel klinisch bewährt (14). Bei Auftrennung der Serum- α -Amylase ist eine je nach Trennverfahren verschiedene Anzahl von Isoenzymbanden beschrieben worden (7, 8, 9). Im hier untersuchten Krankengut von Patienten mit Cystischer Fibrose konnten 4 Isoenzyme sicher unterschieden werden. In größeren Kollektiven gesunder Kontrollpersonen findet sich mit etwa 90–94% am häufigsten eine Kombination der P_2 und S_1 -Isoamylase im Serum (7, 8, 9, 15). Bei den hier untersuchten 14 gesunden Kindern wurde diese Kombination in 86% gefunden, 2 mal konnte nur Pankreasamylase nachgewiesen werden. Im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose hingegen ist die P_2/S_1 -Kombination mit etwa 12% selten.

Da das Isoenzymmuster der Patienten mit Cystischer Fibrose unabhängig von der Serumaktivität der Gesamtamylase ist, kann der Nachweis nur einer Isoamylase durch zu geringe Empfindlichkeit des Nachweissystems nicht ausreichend erklärt werden. Kamarýt et al (16) haben eine Altersabhängigkeit der Isoamylasen im Serum bei Säuglingen beschrieben, bei denen nach der Geburt zunächst die Aktivität der Speichelamylase im Serum deutlich überwiegt und bei denen die der Pankreasamylase als Ausdruck der Induktion erst langsam ansteigt. Am Ende des ersten Lebensjahres beträgt sie etwa ein Drittel der Gesamtaktivität. Bei Erwachsenen ist das Verhältnis von Pankreas- und Speichelamylase etwa gleich (9). Das häufige Fehlen der Pankreasisoamylase im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose dürfte daher bei einem Durchschnittsalter von etwa 8 Jahren nicht ausreichend durch eine Altersabhängigkeit erklärbar sein.

Wie Aw et al (17) zeigten, ist im Urin von Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz das Verhältnis Pankreas- zu Speichelisoamylase zu Gunsten der letztgenannten verändert. Im Pankreozymin/Sekretintest ist bei Pankreasinsuffizienz der Anstieg der Serumaktivität der Amylase gegenüber Kontrollen vermindert (18). Auch das Fehlen der Pankreasisoamylase im Nüchternserum von (nicht stimulierten) Patienten mit Cystischer Fibrose darf als Ausdruck einer Pankreasinsuffizienz gedeutet werden. Bei Fehlen der Speichelisoamylase im Serum konnten Kamarýt et al (19) eine signifikante Verminderung der Amylaseaktivität im Speichel nachweisen.

So kann die Isoenzymbestimmung der α -Amylase im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose dem Kliniker die Möglichkeit geben, die Beteiligung von Pankreas und Speicheldrüse am Krankheitsprozess anteilig zu bewerten.

Tab. 1. Isoenzymmuster der α -Amylase im Serum von Patienten mit Cystischer Fibrose und bei gesunden Kontrollpersonen. P_1 und P_2 Pankreasisoamylasen, S_1 und S_2 Speichelisoamylasen.

Isoamylase-Muster	Patienten mit Cystischer Fibrose	Gesunde Kontrollen
	n	n
P_1	6	2
P_2	7	0
$P_2 + S_1$	4	12
S_1	14	0
$S_1 + S_2$	3	0
	34	14

Literatur

- Chey, W. Y., Shay, H., Nielsen, O. F. & Lorber, St. H. (1967), J. Amer. Med. Ass. 201, 347–350.
- Goebell, H. (1970), Internist 11, 117–122.
- Schmidt, H. & Schläger, R. (1972), Med. Klin. 67, 1717–1722.
- Fritsch, W.-P. & Rick, W. (1971), Krankenhausarzt 44, 418–434.
- Witthöft, C. (1971), Inaug. Diss., Göttingen.
- Muus, J. & Vnenchak, J. M. (1964), Nature 204, 283–285.
- Kamarýt, J. & Laxová, Renata (1965), Humangenetik 1, 579–586.
- Hobbs, J. R. & Aw, S. E. (1968), in Enzymes in urine and kidney (Dubach, U. C., Hrsg.), S. 281–292, Verlag Hans Huber, Bern.
- Wieme, R. J. (1968), in Enzymes in urine and kidney (Dubach, U. C., Hrsg.), S. 293–295, Verlag Hans Huber, Bern.

10. Oger, A. & Bischops, L. (1966), *Clin. Chim. Acta* 13, 670–674.
11. Vacíková, Alena (1972), *J. Chromatogr.* 69, 349–354.
12. Ceska, M., Hultman, E. & Ingelmann, B. (1969), *Experientia* 25, 555–556.
13. Boettcher, B. & De la Lande, F. A. (1969), *Analyt. Biochem.* 28, 510–514.
14. Rajasingham, R., Bell, J. & Baron, D. (1971), *Enzyme* 12, 180–186.
15. Schiwara, H. W. (1973), *diese Z.* 11, 319–320.
16. Kamarýt, J. & Fintajslóvá, Olga (1970), *diese Z.* 8, 564–566.
17. Aw, S. E., Hobbs, J. R. & Wootton, I. (1967), *Gut* 8, 402–407.
18. Adlercreutz, H., Salmi, H. J., Soininen, K. & Härkönen, M. (1973), *Clin. Chim. Acta* 43, 187–193.
19. Kamarýt, J. & Laxová, Renata (1966), *Humangenetik* 3, 41–45.

Dr. N. van Husen,
Prof. Dr. U. Gerlach,
Dr. D. Kamanabroo
Medizinische Universitätsklinik
D 44 Münster
Westring 3

Dr. H.-Chr. Dominick
Universitätskinderklinik
D 44 Münster
Robert Koch Straße 31